# 溴氰菊酯胁迫下小菜蛾幼虫体内差异表达蛋白的分析

李 瑾[1]，李凤良[2]，焦东旭[1]，李 娜[1]，程罗根[1,*]
(1. 南京师范大学生命科学学院，南京 210023；2. 贵州省农业科学院植物保护研究所，贵阳 550009)

**摘要**：小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 是世界性十字花科蔬菜的主要害虫，已对多种杀虫剂产生抗性，其中以对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性发展最快。溴氰菊酯是拟除虫菊酯杀虫剂中杀虫毒力最强的品种。我们前期的研究发现，小菜蛾溴氰菊酯敏感品系(DS)和抗性品系(DR)成虫期的蛋白质双向电泳(2-DE)图谱存在显著差异。本研究通过双向电泳技术从小菜蛾4龄幼虫中分离出89个有明显差异的蛋白点，从中选出30个进行串联质谱(MALDI-TOF-MS)实验，并利用蛋白质数据库检索这些在抗性品系中表达而在敏感品系中不表达或者不同品系中差异表达的蛋白质的归属、性质和功能，最终成功鉴定出10个蛋白。对其中的3个基因进行了荧光定量PCR验证，发现这些蛋白质在mRNA水平的表达与在蛋白水平的表达是一致的。这些在溴氰菊酯胁迫下差异表达的蛋白为研究溴氰菊酯的作用靶标和作用机理，以及筛选与其抗性相关的蛋白质提供了依据。

**关键词**：小菜蛾；蛋白质组；双向电泳；质谱；溴氰菊酯；抗性
**中图分类号**：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2014)01-0036-09

# Proteomic analysis of differentially expressed proteins in larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), under deltamethrin stress

LI Jin[1], LI Feng-Liang[2], JIAO Dong-Xu[1], LI Na[1], CHENG Luo-Gen[1,*] (1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550009, China)

**Abstract**: The diamondback moth, *Plutella xylostella* L., is one of the most destructive pests in cruciferous vegetables (CFV) all over the world and has developed varied resistance to kinds of insecticides, especially the fastest growing resistance to pyrethroids. Deltamethrin is one of the most toxic synthetic pyrethroid pesticides. Our previous research compared the two-dimensional electrophoresis (2-DE) protein profiles between the deltamethrin-sensitive strain (DS) and the deltamethrin-resistant strain (DR) of the diamondback moth at the adult stage, and significant differences had been identified. In this study, 89 protein spots were identified by 2-DE from the 4th instar larvae of *P. xylostella*, and then 30 out of 89 spots were subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis and protein database search to test the proteins expressed only in the resistant strain or differentially expressed in two strains. Thus, 10 protein spots were successfully identified with definite identity, properties and function. Real-time quantitative PCR analysis showed that the expression patterns at the mRNA and protein levels were correlated with each other. This study identifies several proteins that are differentially expressed under the deltamethrin stress, and provides a new scientific basis regarding targets and action mechanisms of deltamethrin and for screening of the resistance-related proteins.

**Key words**: *Plutella xylostella*; proteomics; two-dimensional electrophoresis (2-DE); mass spectrometry; deltamethrin; resistance

目前，蛋白质组学研究越来越受到人们的关注，成为后基因组时代的重要研究领域。蛋白组学

基金项目：国家自然科学基金项目(31071974)
作者简介：李瑾，女，1988年生，河南南阳人，硕士研究生，研究方向为动物分子遗传，E-mail：lijin121500@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：chengluogen@njnu.edu.cn
收稿日期 Received：2013-10-31；接受日期 Accepted：2013-12-20

技术以双向电泳(2-dimensional electrophoresis，2-DE)技术和质谱技术为核心，能对细胞或组织内的蛋白质进行最大限度的分离和鉴定，在生物学医学领域都有着广泛的应用。其中，双向电泳作为分离蛋白质的重要手段，是目前唯一可以在一块凝胶上同时分离数千乃至上万个蛋白质的方法，且分离得到的蛋白质组分纯度高达 90% 以上(Abbott，1999)。随着固相 IPG 干胶条的应用，两性电解质引起的 pH 不稳定、重复性差及碱性蛋白丢失等问题也得到解决，双向电泳技术得到质的飞跃。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱，操作简便，敏感度高，同许多蛋白分离方法相匹配，而且现有数据库中有充足的关于多肽质量/电荷比值的数据，因此成为许多实验室首选的蛋白质谱鉴定方法。

小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 是世界性十字花科蔬菜的主要害虫，为克服小菜蛾对农业发展带来的危害，长期以来人们使用各种农药进行防治，导致小菜蛾对多种杀虫剂产生抗性，其中以对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性发展最快(沈福英，2010)。溴氰菊酯(deltamethrin，DM)是人工合成拟除虫菊酯杀虫剂中杀虫毒力最强的一个品种，对哺乳动物安全，具有广谱、低残留的特点，在生产实践中得到了广泛应用，与其他类型的杀虫剂之间存在着程度不同的交互抗性(刘传秀等，1995)。因此，研究溴氰菊酯的作用机理及其抗性发生机制，在理论和实践上均具有重要意义。在小菜蛾抗溴氰菊酯品系的基因组代表性差异分析、抗性遗传分析和 cDNA 代表性差异分析的基础上，Zhang 等(2013)初步比较了敏感和抗性品系成虫期表达的蛋白质，发现它们的双向电泳图谱有显著差异。但是，小菜蛾的危害是在幼虫期，因此本研究拟在前期工作的基础上，采用双向电泳和质谱技术进一步比较、分析敏感和抗性品系小菜蛾幼虫的差异表达蛋白，为研究溴氰菊酯的作用靶标和作用机理，以及筛选与其抗性相关的蛋白质提供依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

**1.1.1**　供试小菜蛾：源自贵州省贵阳市花溪区中曹乡的甘蓝地(陈之浩等，1990)，室内繁殖一代后测 4 龄幼虫的 $LD_{50}$ 值为 0.083 μg/头，与武汉市蔬菜研究所的小菜蛾敏感品系 4 龄幼虫 $LD_{50}$ 值比较，证明供试小菜蛾为敏感种群，将其隔离培养。溴氰菊酯抗性品系是通过点滴法处理小菜蛾 4 龄幼虫敏感品系，经多代繁殖选育而成，与敏感品系相比，抗性系数在 5 000 倍以上。

**1.1.2**　主要试剂及仪器：ReadyStrip™ IPG Srtips 17 cm (pH 3 – 10 nonlinear)、Bio-Lyte 3-10 Ampholyte、胶条覆盖油、低熔点琼脂糖购自 BIO-RAD 公司；RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司；枪头、离心管购自 Axygen 公司；Taq 聚合酶、Primerscript™ RT Reagents Kit、SYBR® Premix Ex Taq 购自 TaKaRa 公司；引物由上海生工生物工程技术服务有限公司代为合成。仪器设备：IPGphor 等电聚焦仪及其附件、Ettan DALT Six SDS-PAGE 垂直电泳系统、图像扫描仪及分析软件 ImageMaser 2D Elite (Amersham Biosciences 公司)，NanoDrop 2000 核酸蛋白定量仪(Thermo Scientific 公司)，Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪(Corbett Research 公司)。

### 1.2　小菜蛾幼虫差异表达蛋白的分离与鉴定

**1.2.1**　蛋白样品的制备：参照 Zhang 等(2013)的方法，随机取敏感和抗性品系小菜蛾 4 龄幼虫各 10 头，液氮研磨，粉末悬浮于含 10% 三氯乙酸的丙酮提取液，沉淀 2 h，再用预冷丙酮溶液清洗，待丙酮完全挥发加入裂解液溶解沉淀，超声破碎，离心取上清。Bradford 法定量蛋白(Bradford，1976)，分装，–20℃保存。

**1.2.2**　双向电泳：按 Amersham 公司双向电泳手册和 Görg 等(1988)方法，Immobiline DryStrip 泡胀盘内进行 IPG 胶条水化，17 cm 胶条蛋白上样量为 150 μg(340 μL)，泡胀 12 h，等电聚焦仪 IPGphor 上进行第一向等电聚焦，聚焦程序为：100，300 和 500 V 低压各 2 h，8 000 V 升压 4 h，8 000 V 聚焦 5 h，500 V 低压保存。聚焦后的胶条需要在平衡缓冲液中平衡两次，每次 15 min。平衡后胶条转移至 12.5% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行第 2 向电泳(SDS-PAGE)，15℃恒温，采用恒功率电泳，开始时 1 W/gel，1 h，再用 13 W/gel 直到溴酚兰迁移至凝胶底部。每个样本重复 3 次，以保证实验结果的稳定性。凝胶采用与质谱兼容的银染法染色。

**1.2.3**　图像采集与分析：利用 Imagescanner 扫描仪在 300 像素(dpi)的分辨率下对凝胶进行扫描。使用 Imagemaster 2D Platinum 软件对凝胶进行分析，检测蛋白点数目、大小、强弱，筛选差异点，创

建一个挖胶点报告。

**1.2.4** 质谱鉴定：切割蛋白质点置于离心管中，进行胶内酶解，将所得的肽段通过 MALDI-TOF/TOF 上机获取蛋白样品的肽质量指纹图(由深圳华大基因科技服务有限公司完成)，最后应用 Mascot 软件在小菜蛾基因组数据库 P. xylostella_AGCT (18 073条序列)中搜寻，获得蛋白质的相关信息。

### 1.3 抗性相关基因的 mRNA 表达谱分析

**1.3.1** 总 RNA 的提取：随机取敏感和抗性品系 4 龄小菜蛾幼虫各 10 头，液氮中研磨成粉末，然后根据 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒使用说明，各提取出 50 μL RNA 样品，分装，-70℃保存备用。用 NanoDrop 核酸定量仪测定 RNA 的浓度和 $OD_{260}/OD_{280}$的比值。此外，利用琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的纯度和完整性。

**1.3.2** cDNA 的合成：采用 Primerscript™ RT Reagents Kit (TaKaRa)试剂盒，根据其说明书，进行 cDNA 第一链的合成。反转录反应条件：37℃ 15 min；85℃ 5 s。

**1.3.3** PCR 引物的设计与合成：分析质谱鉴定结果，随机挑选出 3 个已鉴定的蛋白点，搜索 GenBank 的 EST 数据库得到蛋白质的 cDNA 序列，同时运行 BLAST 程序进行序列一致性比对分析。根据荧光定量引物设计原则，利用 Primer 5.0 设计引物，以 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)基因作为内参基因(表 1)。荧光定量 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列**

**Table 1 Primer sequences used for real-time quantitative RT-PCR**

| 基因名称 Gene name | 引物名称 Primer name | 引物序列(5′-3′) Primer sequence |
|---|---|---|
| Arginine kinase (KARG) gene | Sense KARG | AGAAGACCGACAAGCAC |
| | Anti-sense KARG | CCAGTCAGGGGGTAGAA |
| Fructose-bisphosphate aldolase (ALF) gene | Sense ALF | ACAAGAAGTCCTACACAT |
| | Anti-sense ALF | CACCATACCGTCACAGTC |
| Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP) gene | Sense TCTP | ACAAGAAGTCCTACACA |
| | Anti-sense TCTP | ACCATACCGTCACAGTC |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene | Sense GAPDH | TGGAAGGTGGTGCCAAGAA |
| | Anti-sense GAPDH | AAGGGGAGCGAGGCAGTTAG |

**1.3.4** Real-time PCR 反应：以反转录的 cDNA 为模版，设置 5 个浓度梯度，使用上述设计的引物，制作标准曲线，分析其扩增效率，使目的基因与内参基因扩增效率基本一致，确定最适浓度。反应体系为 20 μL：2 μL cDNA 模版，10 μL 2×SYBR® Premix Ex Taq，正向反向引物各 0.4 μL，去离子水 7.2 μL。反应采用两步法：95℃ 30 s 预变性；95℃ 5 s，60℃ 30 s，40 个循环。每个样品做 3 次重复，实验结束采集扩增曲线和溶解曲线，并根据 Ct 值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$方法分析目标基因的相对表达量及其标准误。

### 1.4 数据统计与分析

定量 PCR 数据应用 SPSS17.0 进行数据分析。数据标准误差采用平均值标准误(*SE*)，数据间的差异显著性分析采用 One-Way ANOVA 方法，多重比较采用 Tukey 氏检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 小菜蛾幼虫总蛋白的二维电泳分离

经多次实验，构建了高分辨率和重复性较好的溴氰菊酯敏感和抗性品系小菜蛾 4 龄幼虫的蛋白质双向电泳图谱(图 1)，从图中可以看到蛋白质在两个方向都得到较好的分离，并检测到大量蛋白质斑点。实验采用 pH 3~10，17 cm 非线性固相 IPG 胶条，两个蛋白样品上样量均为 150 μg，水化 12 h，等电聚焦达到 70 kVh，再通过 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行第 2 向分离，银染显色后经软件分析，检测到蛋白点约 900 个，通过凝胶自动匹配和差异筛选，结果显示：其中 89 个匹配的蛋白点存在表达量上的差异，与敏感品系相比，在抗性品系中有 38 个蛋白点表达量下调，有 51 个点表达量上

调。这些差异点大多为量的差异，但有 18 个蛋白点表现出质的差异，即只在抗性品系中表达，而在敏感品系中未发现这些蛋白点，推测这些差异蛋白点可能与小菜蛾幼虫的溴氰菊酯抗性相关，本实验将着重对这些点进行鉴定和分析。

### 2.2　差异点的质谱鉴定与分析

从 89 个点中筛选出 30 个表达量差异 2.5 倍以上的蛋白点进行质谱鉴定，其中在抗性品系中表达量上调的点 20 个，表达量下调的点 10 个。将这些差异蛋白点从凝胶中切下进行胶内酶解，通过

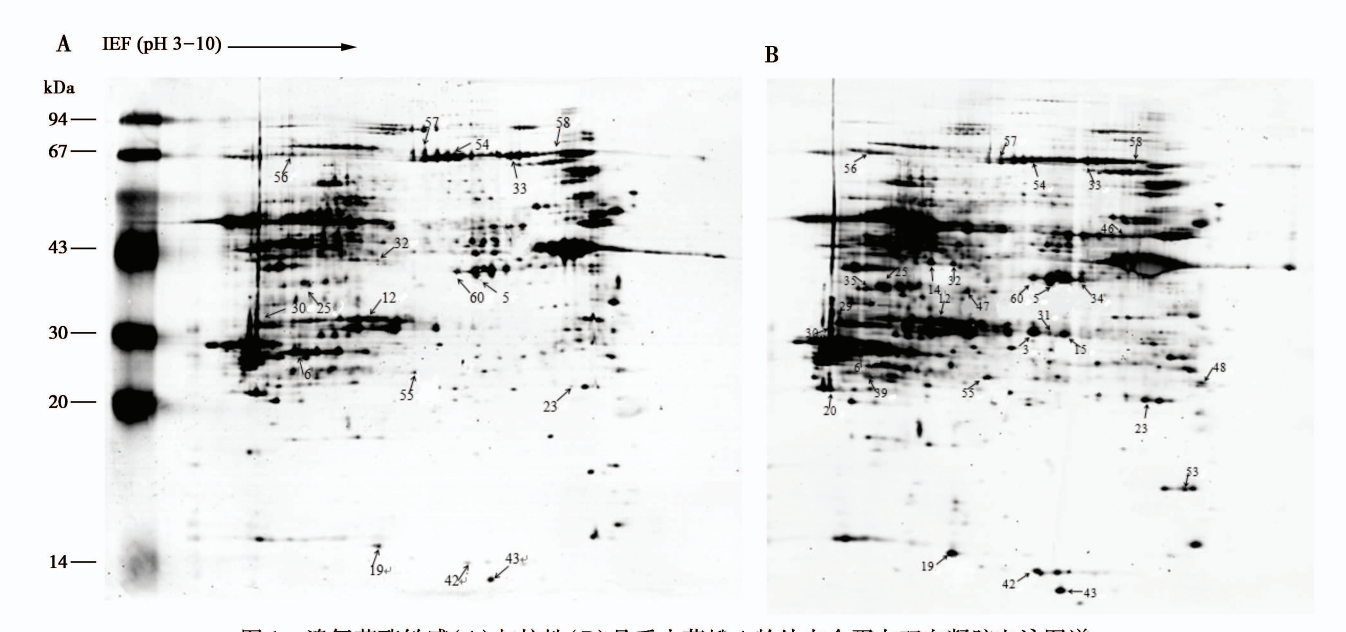



图 1　溴氰菊酯敏感(A)与抗性(B)品系小菜蛾 4 龄幼虫全蛋白双向凝胶电泳图谱

Fig. 1　Two-dimensional electrophoresis maps of total proteins from the 4th instar larvae of the deltamethrin-sensitive (A) and resistant (B) strains of *Plutella xylostella*

采用 pH 3 ~ 10，17 cm 非线性胶条进行第 1 向分离，蛋白上样量为 150 μg，第 2 向采用 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，硝酸银染色，最终筛选出 30 个蛋白点进行质谱鉴定。Proteins (150 μg) were separated on 1st-dimensional pH 3 – 10, 17 cm nonlinear IPG gel and 2nd-dimensional 12.5% SDS-PAGE gel, and visualized by silver staining, and finally 30 spots were picked for MALDI-TOF-MS analysis.

**表 2　溴氰菊酯敏感和抗性品系小菜蛾 4 龄幼虫体内差异表达蛋白的质谱鉴定结果**

**Table 2　Identification of the differentially expressed proteins between the 4th instar larvae of the deltamethrin-sensitive (DS) and resistant (DR) strains of *Plutella xylostella***

| 样品编号 Sample ID | 蛋白名称 Protein name | GenBank 登录号 GenBank accession number | 分子量 Protein mass | 分值 Mascot score | 等电点 Isoelectric point | 鉴定覆盖率(%) Coverage rate |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | Arginine kinase | gi\|442631209 | 55 721.08 | 363 | 7.86 | 53.50 |
| 14 | Enolase | gi\|442625239 | 46 835.16 | 191 | 5.51 | 58.43 |
| 19 | Nucleoside diphosphate kinase A2 | gi\|148236676 | 17 213.93 | 209 | 7.51 | 62.75 |
| 23 | Asparagine synthetase | gi\|429240607 | 46 835.16 | 419 | 5.51 | 57.97 |
| 31 | Proteasome subunit alpha type-1 | gi\|320544877 | 30 834.56 | 152 | 7.08 | 43.88 |
| 34 | T-complex protein | gi\|84000142 | 203 015.52 | 80.3 | 5.90 | 26.60 |
| 35 | Fatty acid binding protein 6 | gi\|402692460 | 160 648.99 | 87 | 4.83 | 35.83 |
| 47 | Fructose-bisphosphate aldolase | gi\|442621245 | 47 456.63 | 183 | 8.86 | 28.97 |
| 53 | Translationally-controlled tumor protein homolog | gi\|53148464 | 19 814.62 | 215 | 4.49 | 61.63 |
| 55 | Protein l(2)37Cc | gi\|442628310 | 29 916.08 | 486 | 6.82 | 59.85 |

MALDI-TOF-TOF 上机，得到 30 张肽指纹图谱，原始谱图数据包括一级谱，以及由一级谱中的若干最强峰产生的二级谱。然后将获得的图谱数据通过 Mascot 进行数据库搜索，最终匹配到的已知蛋白有 10 个(表 2)。这些鉴定成功的蛋白质分别为：精氨酸激酶、烯醇酶、核苷二磷酸激酶 A2、天冬酰胺合成酶、蛋白酶体 α 亚基 1 型、t-复合多肽、脂肪酸结合蛋白 6、果糖-二磷酸醛缩酶、翻译控制肿瘤蛋白同源蛋白、致死因子，除 spot 5 外，其他蛋白点均在抗性品系中上调，且 spot 31，34，35，47 和 53 只在抗性品系中出现。此外，还有 15 种蛋白未在数据库中搜寻到同源序列，需要进一步确定。

### 2.3 差异点基因转录水平的表达分析

基因在翻译水平的表达与转录水平的表达密切相关，从已鉴定成功的蛋白点中随机挑选 3 个进行实时荧光定量 PCR 验证，分析基因在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达是否一致。PCR 定量结果显示：在抗性品系和敏感品系中，这 3 个基因均能表达且有显著差异，相对于敏感品系，spot 5(精氨酸激酶)在抗性品系中表达量为 27%，spot 47(果糖-二磷酸醛缩酶)、spot 53(翻译控制肿瘤蛋白同源蛋白)在抗性品系中的表达量分别为敏感品系的 3.67 倍和 3.28 倍，结果与双向电泳结果一致(图 2)。

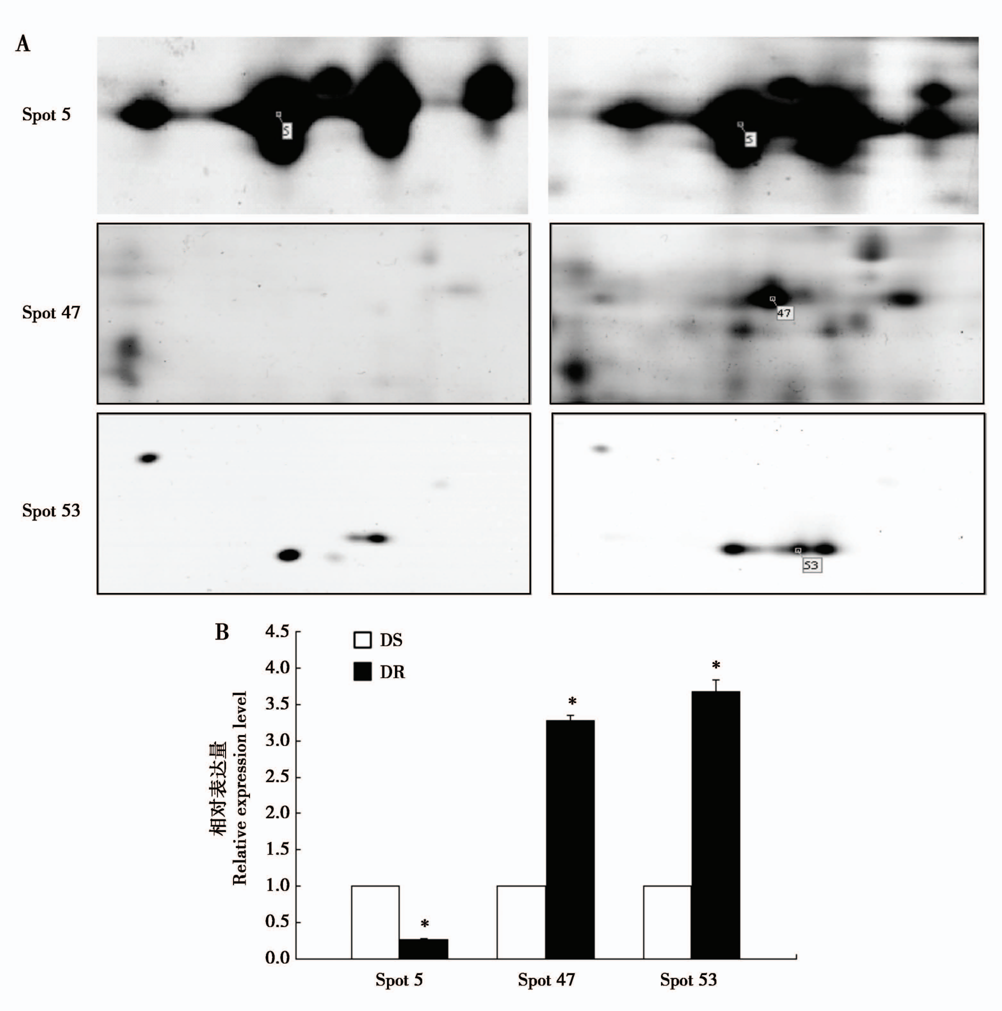



图 2 溴氰菊酯敏感(DS)与抗性(DR)品系小菜蛾 4 龄幼虫体内差异表达的 3 个基因在蛋白(A)与 mRNA(B)水平的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of three genes at the protein (A) and mRNA (B) levels between the 4th instar larvae of the deltamethrin-sensitive (DS) and resistant (DR) strains of *Plutella xylostella*

Spot 5：精氨酸激酶 Arginine kinase；Spot 47：果糖-二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase；Spot 53：翻译控制肿瘤蛋白同源蛋白 Translationally-controlled tumor protein homolog. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上星号表示在 DS 与 DR 比较中表达水平有显著差异(Turkey 氏检验，$P<0.01$)；DS 中基因的表达水平设置为 1，选取 GAPDH 基因作为标准化内参，用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。Data in the figure are mean ± *SE*. The asterisk indicates significant difference between DS and DR (Turkey's test, $P<0.01$). The relative expression levels of the three genes are determined by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method compared with that in the DS, and GAPDH gene is selected as the housekeeping gene.

# 3　讨论

小菜蛾是十字花科蔬菜的主要害虫，由于杀虫剂的大量使用，对多种杀虫剂产生了抗药性，已成为病虫害防治工作中的一大难题。在这种情况下，了解抗性反应机制对于农业生产有重要的意义。昆虫的抗药性是在杀虫剂作用下自身生理生化特性改变所引起的，而蛋白质作为各种代谢和调控途径的主要执行者，不仅是多种致病因子对机体作用最重要的靶分子，也是大多数药物的靶标，因此直接从蛋白质水平研究溴氰菊酯胁迫下小菜蛾的表达差异，有助于详细了解溴氰菊酯的伤害机制以及小菜蛾的适应机制。Zhang 等(2013)初步比较了敏感和抗性品系成虫期表达的蛋白质，发现它们的双向电泳图谱有着显著的差异，但是小菜蛾的主要危害是在幼虫期，而且同一蛋白在不同生理阶段其表达水平也有很大差异。因此，分析幼虫在溴氰菊酯胁迫下蛋白质表达谱的变化，不仅有助于阐述抗性机理、分析交互抗性，还有望筛选出溴氰菊酯的分子靶标。

本研究首先通过双向电泳技术从小菜蛾 4 龄幼虫中分离出 89 个有明显差异的蛋白点，从中筛选出 30 个进行串联质谱实验并利用蛋白质数据库检索这些在抗性品系中表达而在敏感品系中不表达或者不同品系中差异表达的蛋白质的归属、性质和功能，最终成功鉴定出 10 个蛋白，这些蛋白涉及基础代谢、蛋白折叠与降解、转录调控以及致死因子；接下来又从中选取 3 个蛋白进行荧光定量 PCR 验证，发现这些蛋白质在 mRNA 水平的表达与在蛋白水平的表达是一致的。

## 3.1　代谢相关蛋白

精氨酸激酶(spot 5)、烯醇酶(spot 14)、核苷二磷酸激酶 A2 (spot 19)、果糖-二磷酸醛缩酶(spot 47)、天冬酰胺合成酶(spot 23)和脂肪酸结合蛋白 6(spot 35)都属于代谢相关蛋白。精氨酸激酶是无脊椎动物体内调节能量代谢最重要的酶之一，在能量较多时形成磷酸精氨酸贮存能量，在细胞活动需要能量过程中产生 ATP。近年的研究表明，能量代谢在动物适应外界不良环境因子及免疫反应中起到重要的作用，与能量代谢有关的酶也直接或间接参与相关的免疫反应，同时也因各种刺激而发生剧烈变化。通过蛋白质组学技术对缺氧条件下日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* 的蛋白表达谱进行分析，发现精氨酸激酶表达量明显上调(Abe *et al.*, 2007)。在过氧化氢压力下，处理组克氏锥虫 *Trypanosoma cruzi* 精氨酸激酶表达量是对照组的 10 倍(Miranda *et al.*, 2006)。Astrofsky 等(2002)发现感染 WSSV 病毒的细角滨对虾 *Penaeus stylirostris* 精氨酸激酶的 cDNA 表达量上调。以上这些研究表明，精氨酸激酶在面对恶性环境以及病原侵袭时表达量明显上升。该蛋白在溴氰菊酯胁迫下的敏感品系中表达上调，同时荧光定量 PCR 的结果也验证了其表达量的差异，但目前精氨酸激酶在免疫应答过程中的作用及机理尚缺乏系统研究。烯醇酶、核苷二磷酸激酶 A2、果糖-二磷酸醛缩酶为糖酵解酶，都在抗性品系中表达上调，其中果糖-二磷酸醛缩酶只在抗性品系中鉴定出来。烯醇酶作为糖酵解途径中的一种酶，它还是一种多功能蛋白，能与细胞骨架蛋白和多聚核苷酸结合、还具有热休克蛋白的功能，此外，它的染色质结构表明在转录和许多病理过程中也发挥重要作用(Pancholi, 2001)。有研究表明，烯醇酶可作为应激蛋白，在缺氧条件下表达量上调(Aaronson *et al.*, 1995)，同时神经元特异性烯醇酶(neuron specific enolase, NSE)的表达水平还可作为检测缺氧性脑损伤的生化指标，但其与昆虫抗药性相关的生理功能还未见报道。核苷二磷酸激酶除了调控细胞内核苷酸的平衡(Boissan *et al.*, 2009)，它还参与许多生理过程如微管的装配和信号转导，其活性的降低将会导致细胞功能的紊乱，有研究发现在果蝇幼虫 *awd* 突变体中因丧失核苷二磷酸激酶活性出现了大量死亡和形态异常。溴氰菊酯胁迫下其在敏感品系中的低表达可能导致小菜蛾相关生理功能紊乱甚至死亡。果糖-二磷酸醛缩酶作为糖酵解酶在缺氧以及嘌呤缺失的情况下，增加能量和嘌呤的合成，同时又是一种纤维蛋白溶酶原的结合蛋白，可以激活纤维蛋白溶酶原，形成具有蛋白水解酶功能的纤维蛋白溶酶(Crowe *et al.*, 2003)。已有文献研究，抗体可以催化醛缩合反应，免疫过程通过活性共价化合物捕获一个赖氨酸残基和抗体结合在一起，形成一个稳定的酰胺环境，从而催化醇醛缩合反应(Wagner *et al.*, 1995)，该蛋白的表达上调可能是小菜蛾抗药性作用发挥从而促进其在体内表达。这 3 种蛋白均在抗性品系中表达上调，推测其功能与小菜蛾抗药性有一定关联，并在抵御杀虫剂毒害过程中发挥作用。天冬酰胺合成酶属于氨基转移酶家族成员之一，催化合成天冬酰胺(asparagine, Asn)，从而为蛋白质的合成提供原料。

治疗急性淋巴白血病的原理就是发现在某些种类的恶性淋巴细胞中此酶活性很低(Horowitz *et al*., 1968),不能合成足够量的天冬酰胺,需要依靠细胞外界环境中的天冬酰胺,当用左旋天冬酰胺酶(L-asparaginase, L-Asp)消化细胞外环境中的天冬酰胺时,细胞的蛋白质合成就会受阻,细胞将凋亡。该蛋白在小菜蛾敏感品系中表达量明显低于抗性品系,推测可能在溴氰菊酯长期胁迫下,敏感品系小菜蛾幼虫天冬酰胺合酶活性降低,导致无法合成足够蛋白质进行正常的生理活动和新陈代谢。脂肪酸结合蛋白6属于脂结合蛋白超家族成员,主要功能是参与体内脂肪代谢(蒋金津等, 2009)。Li AQ等(2007)比较了滞育和正常家蝇蛹的脑部蛋白组,在滞育蛹中,脂肪酸结合蛋白的表达量明显下调,除此之外,脂肪酸结合蛋白与炎症、代谢和免疫反应通路密切相关,其表达量还可作为慢性代谢疾病如心肌梗死、脂肪肝、动脉粥样硬化的检测标准(Glatz *et al*., 1998),但与抗性相关的功能未见报道。该蛋白在敏感品系中未鉴定出来,可能是表达量过低或者表达受到抑制,进而影响小菜蛾体内脂肪的代谢,推测其与抗药性有一定关系。

### 3.2 参与蛋白质折叠与降解的蛋白

蛋白酶体 α 亚基 1 型(spot 31)和 t-复合多肽(spot 34)是参与蛋白折叠与降解的一类蛋白质,主要作用是降解细胞内不需要的或受到损伤的蛋白质。蛋白酶体所参与的泛素-蛋白酶体系统对于许多细胞进程,包括细胞周期、基因表达的调控、氧化应激反应等都必不可少。Sun等(2013)通过比较蛋白组学的方法对溴氰菊酯敏感品系和抗性品系的蚊子进行鉴定分析,发现蛋白酶体 β 亚基 6 型(proteasome beta 6 types, PSMB6)在抗性品系中表达量较高,又通过药物抑制剂和分子生物学方法研究PSMB6在溴氰菊酯抗性中的作用,结果显示蛋白酶体抑制剂MG-132和bortezomib均提高抗性品系细胞和幼虫的敏感性,同时PSMB6基因的敲除则大大降低了溴氰菊酯胁迫下细胞的存活率,从而得出结论PSMB6是与蚊子的溴氰菊酯抗性密切相关。本实验中蛋白酶体 α 亚基 1 型只在小菜蛾抗性品系中鉴定出来,推测其表达量上调能够及时有效降解受损伤的蛋白,从而抵御溴氰菊酯的胁迫。t-复合多肽(CCT的 α 亚基)是一种广泛存在于细胞浆中的异型寡聚蛋白,也是迄今为止真核细胞胞浆中发现的唯一伴侣素,属于伴侣素Hsp60家族。CCT与细胞骨架间紧密联系(段芳蕾等, 2011),而细胞骨架与细胞的许多重要生理功能有关,如内皮细胞通透性、单核细胞的变形运动、细胞周期等,细胞骨架的异常会导致细胞功能异常,从而促使疾病的发生。同时Hsp60作为热休克蛋白家族成员之一,是生物抵御高温等环境胁迫的主要辅助蛋白,可提高机体对不良环境的耐受性,Hsp60还能协助变性、不可溶的凝聚蛋白重新恢复天然构象,它在许多病原体传染过程中都是一种免疫优势抗原。刘开林等(2007)研究表明热休克蛋白的表达与阿维菌素的抗性有一定关系。Yoshimi等(2002)发现一种水生蚊子在受到污染的河流中,对有机磷、杀螟松、菊酯等有抗性,而且证明杀虫剂是Hsp70表达量增加的一个潜在因素。溴氰菊酯胁迫下该蛋白在敏感品系中表达量过低或者不表达,可能导致与细胞骨架及相关生理功能紊乱进而导致死亡,推测其与抗药性相关,但在害虫抗药性机理中的具体作用有待进一步研究。

### 3.3 转录调控蛋白

翻译控制肿瘤蛋白TCTP(spot 53)是一个高度保守、广泛表达的转录调控蛋白,具有抗凋亡、细胞外组胺释放蛋白、肿瘤的恶性转移,调节细胞骨架的动态变化和细胞的生长与增殖等多种重要的生物学功能(Bommer and Thiele, 2004)。在肺癌细胞系A549细胞中超表达TCTP能够逆转由p53介导的细胞凋亡,而利用miRNA干涉TCTP的表达则增加了细胞的凋亡(Rho *et al*., 2011)。果蝇TCTP(dTCTP)对细胞的生长和增殖至关重要,干涉dTCTP的表达使果蝇的眼睛、翅膀、背板等组织减小甚至在蛹阶段就会死亡并且其身体尺寸也明显减小,在果蝇中超表达cyclin E和细胞凋亡抑制剂p35则可以挽救由干涉dTCTP所引起的表型改变,表明果蝇缺失dTCTP导致了细胞增殖的缺陷和诱导细胞的凋亡(Hsu *et al*., 2007)。TCTP表达量与生物体抗药性及抗病毒也有一定关联,Walker等(2000)发现,在青蒿素抗性的恶性疟原虫 *Plasmodium yoelii* 体内TCTP的表达量是敏感品系的2.5倍,Pan等(2005)通过研究感染WSSV病毒的日本对虾 *Penaeus japonicus* 发现抗病毒品系中TCTP表达量明显上调。我们的研究发现TCTP在敏感品系中的表达量明显低于抗性品系,这一点在蛋白质水平和mRNA水平都得到验证,推测在杀虫剂胁迫下其表达量降低影响细胞活性,导致增殖缺陷和细胞凋亡,从而使敏感品系小菜蛾无法抵御溴氰菊酯毒害,该蛋白很可能在昆虫抗药性方面发挥

重要作用。

### 3.4　生长因子

致死因子(spot 55)是一种生长因子，与幼虫的新陈代谢密切相关。研究表明，Lethal (2) 37Cc 在果蝇的胚胎早期，胚胎晚期，3 龄幼虫和成虫体内均有所表达，并且表达量有明显差异(Li *et al.*, 2009)。它与 DNA 修复和细胞周期调控相关，有可能在幼虫的新陈代谢以及幼虫向蛹的进化过程中发挥重要作用(Li JK *et al.*, 2007)。本实验中，该蛋白在敏感品系小菜蛾 4 龄幼虫体内未鉴定出来，推测溴氰菊酯的胁迫作用使其缺失或低表达，从而导致小菜蛾幼虫无法进行正行的新陈代谢以及生长发育。

通过对已鉴定成功蛋白的讨论分析，发现大多数蛋白都直接或间接的与昆虫抗药性相关，表明小菜蛾溴氰菊酯抗性的发生是多种蛋白共同作用的结果，这也与前期研究小菜蛾对溴氰菊酯抗性遗传分析结果一致，即多基因遗传(李凤良等, 2000)。在这些鉴定成功的蛋白点中，并未发现已报道的与昆虫解毒有关的杀虫剂抗药基因，包括 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运载体蛋白家族，P450 单加氧酶(P450 single oxygenase, P450s)，谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GSTs)和羧酸酯酶(carboxylesterase, COEs)，同时在小菜蛾成虫的蛋白组学研究中也未鉴定到这几类蛋白，出现这种情况可能有以下几个原因：一是实验方法导致解毒酶未被成功分离和鉴定，本实验所采用的蛋白提取方法、胶条 pH 范围、显色方法的灵敏度、质谱检测前的酶解条件以及解毒酶本身的性质等原因导致它无法通过这种方法进行分离鉴定；二是双向电泳技术本身的局限性，极酸、极碱、极高分子量和低丰度蛋白是不易被检测到的，而且质谱技术鉴定蛋白质强烈依赖于基因组数据库、生物信息学等，这就导致很多蛋白得不到准确鉴定；三是解毒酶已成功分离，但在筛选蛋白点进行串联质谱鉴定时未被选中，从而没有相关的质谱鉴定信息。上述的任何一个或几个原因都可能导致这种现象的发生。在与成虫体内鉴定到的蛋白进行比较时，我们还发现成虫和幼虫体内鉴定到的差异蛋白完全不同，这也进一步表明了蛋白质在不同的生理时期有不同的表达以及研究幼虫在溴氰菊酯胁迫下蛋白质表达谱变化的必要性。

总之，本研究发现了溴氰菊酯作用下小菜蛾幼虫体内差异表达的蛋白，这些蛋白涉及能量代谢、糖酵解、氨基酸代谢、脂质代谢、蛋白质折叠与降解、转录调控以及致死因子诸多方面。这些差异表达的蛋白为进一步研究溴氰菊酯的作用靶标和作用机理，了解杀虫剂抗药性机制的产生提供了依据。

## 参考文献(References)


Aaronson RM, Graven KK, Tucci M, McDonald RJ, Farber HW, 1995. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46): 27752 –27757.

Abbott A, 1999. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*, 402(6763): 715 –720.

Abe H, Hirai S, Okada S, 2007. Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(1): 40 –46.

Astrofsky KM, Roux MM, Klimpel KR, Fox JG, Dhar AK, 2002. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Archives of Virology*, 147(9): 1799 –1812.

Boissan M, Dabernat S, Peuchant E, Schlattner U, Lascu I, Lacombe ML, 2009. The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 329 (1 –2): 51 –62.

Bommer UA, Thiele BJ, 2004. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(3): 379 –385.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248 –254.

Chen ZH, Liu CX, Li FL, Han ZJ, 1990. Initial report on the method for succession reproduction and raising cabbage moth in large scale. *Guizhou Academy of Agricultural Sciences*, (4): 52 –53. [陈之浩, 刘传秀, 李凤良, 韩招久, 1990. 小菜蛾继代繁殖大量饲养方法研究初报. 贵州农业科学, (4): 52 –53]

Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NAR, Booth NA, 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular Microbiology*, 47 (6): 1637 –1651.

Duan FL, Sun XW, Cao L, 2011. The chaperonin containing tailless complex polypeptide 1 (CCT) and its relationship with the cytoskeleton. *Chinese Journal of Cell Biology*, 33(7): 822 –825. [段芳蕾, 孙兴旺, 曹灵, 2011. 真核细胞伴侣素 CCT 及其与细胞骨架的关系. 中国细胞生物学学报, 33(7): 822 –825]

Glatz JFC, van der Vusse GJ, Simoons ML, Kragten JA, van Dieijen-Visser MP, Hermens WT, 1998. Fatty acid-binding protein and the early detection of acute myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta*, 272(1): 87 –92.

Görg A, Postei W, Günther S, 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9: 531 –546.

Horowitz B, Madras BK, Meister A, Old LJ, Boyse EA, Stockert E,

1968. Asparagine synthetase activity of mouse leukemias. *Science*, 160(3827): 533 – 535.

Hsu YC, Chern JJ, Cai Y, Liu M, Choi KW, 2007. *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature*, 445(7129): 785 – 788.

Jiang JJ, Chen LX, Zou ZD, 2009. Research progress on fatty acid binding protein. *Animal Husbandry and Feed Science*, 30(2): 6 – 8. [蒋金津, 陈立祥, 邹增丁, 2009. 脂肪酸结合蛋白的研究进展. 畜牧与饲料科学, 30(2): 6 – 8]

Li AQ, Popova-Butler A, Dean DH, Denlinger DL, 2007. Proteomics of the flesh fly brain reveals an abundance of upregulated heat shock proteins during pupal diapause. *Journal of Insect Physiology*, 53(4): 385 – 391.

Li FL, Cheng LG, Han ZJ, Li ZY, Chen ZH, 2000. Genetic analyses of deltamethrin resistance in diamond back moth, *Plutella xylostella* L. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 13(4): 62 – 66. [李凤良, 程罗根, 韩招久, 李忠英, 陈之浩, 2000. 小菜蛾对溴氰菊酯的抗性遗传分析. 西南农业学报, 13(4): 62 – 66]

Li J, Zhang L, Feng M, Zhang Z, Pan Y, 2009. Identification of the proteome composition occurring during the course of embryonic development of bees (*Apis mellifera*). *Insect Molecular Biology*, 18(1): 1 – 9.

Li JK, Li HW, Zhang ZH, Pan YH, 2007. Identification of the proteome complement of high royal jelly producing bees (*Apis mellifera*) during worker larval development. *Apidologie*, 38(6): 545 – 557.

Liu CX, Li FL, Han ZJ, Chen ZH, 1995. Studies on deltamethrin resistance breeding and its resistant mechanism of dlamondback moth. *Acta Phytophylacica Sinica*, 22(4): 367 – 372. [刘传秀, 李凤良, 韩招久, 陈之浩, 1995. 小菜蛾对溴氰菊酯抗性选育及其机理. 植物保护学报, 22(4): 367 – 372]

Liu KL, He L, Miu YL, Zhang YP, Wang JJ, Zhao ZM, 2007. The impact of high temperature and abamectin to *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval) and expression of heat shock protein. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23(1): 249 – 253. [刘开林, 何林, 缪应林, 张云鹏, 王进军, 赵志模, 2007. 高温和阿维菌素对朱砂叶螨的胁迫效应及热休克蛋白研究. 中国农学通报, 23(1): 249 – 253]

Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA, 2006. *Trypanosoma cruzi*: oxidative stress induces arginine kinase expression. *Experimental Parasitology*, 114(4): 341 – 344.

Pan D, He N, Yang Z, Liu H, Xu X, 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental & Comparative Immunology*, 29(2): 103 – 112.

Pancholi V, 2001. Multifunctional α-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(7): 902 – 920.

Rho SB, Lee JH, Park MS, Byun HJ, Kang S, Seo SS, Kim JY, Park SY, 2011. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, 585(1): 29 – 35.

Shen FY, 2010. Research progress on insecticide resistance management in diamondback moth. *Journal of Hebei Agriculture Sciences*, 14(8): 58 – 60. [沈福英, 2010. 小菜蛾抗药性治理及研究进展. 河北农业科学, 14(8): 58 – 60]

Sun L, Ye Y, Sun H, Yu J, Zhang L, Sun Y, Zhang D, Ma L, Shen B, Zhu C, 2013. Identification of proteasome subunit beta type 6 (PSMB6) associated with deltamethrin resistance in mosquitoes by proteomic and bioassay analyses. *PLoS ONE*, 8(6): e65859.

Wagner J, Lerner RA, Barbas CF, 1995. Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes. *Science*, 270(5243): 1797 – 1800.

Walker DJ, Pitsch JL, Peng MM, Robinson BL, Peters W, Bhisutthibhan J, Meshnick SR, 2000. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2): 344 – 347.

Yoshimi T, Minowa K, Karouna-Renier NK, Watanabe C, Sugaya Y, Miura T, 2002. Activation of a stress-induced gene by insecticides in the midge, *Chironomus yoshimatsui*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(1): 10 – 17.

Zhang NN, Zhang H, Cheng C, Li FL, Gao SQ, Cheng LG, 2013. A comparative profiling of protein expression in the deltamethrin-sensitive and resistant strains of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Acta Entomologica Sinica*, 56(1): 1 – 8. [张娜娜, 张宏, 程晨, 李凤良, 高少奇, 程罗根, 2013. 小菜蛾溴氰菊酯敏感和抗性品系蛋白质表达谱的比较分析. 昆虫学报, 56(1): 1 – 8]

(责任编辑: 赵利辉)